

29-5 - Blütentest hat sich zur Prüfung von Feuerbrandmitteln bewährt

Detached blossom test is well-suited for assessment of fire blight control agents

Stefan Kunz

Bio-Protect GmbH

Der Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* verursacht an Apfel und Birne große wirtschaftliche Schäden. Im Extremfall müssen Bäume oder ganze Obstanlagen gerodet werden. Wichtiges Element der Feuerbrandbekämpfung sind sanitäre Maßnahmen um das Erregerpotenzial niedrig zu halten. Trotzdem kann es während der Blüte zu einer starken Vermehrung und Ausbreitung des Erregers und damit zu flächendeckendem Befall kommen. Monitoring des Erregers in der Blüte unterstützt die anhand von Wetterdaten errechnete Vorhersage von Infektionsterminen (Hinze et al.). Um diese Infektionen zu verhindern, benötigt der Obstbau Präparate und Strategien zur Bekämpfung von Blüteninfektionen. Seit den 1990ern werden Alternativen zum Antibiotikum Streptomycin gesucht und in Freilandversuchen mit künstlicher Inokulation wurden seither von verschiedenen Versuchsanstellern über 100 Präparate und Strategien geprüft (Kunz & Donat). Freilandversuche mit diesem Quarantäneerreger sind teuer und aufwändig. Deshalb wurde bei der Firma Bio-Protect in Zusammenarbeit mit der Universität Konstanz ein Blütentestsystem etabliert, welches eine schnelle Wirksamkeitsprüfung gegen Feuerbrand ermöglicht. In verschiedenen Entwicklungsprojekten wurde dieses System zum Screening von Wirkorganismen und zur Produktentwicklung unter anderem von Blossom Protect verwendet (Kunz, 2004, Kunz et al., 2011, Chen et al., 2009). Das Testsystem wurde so optimiert, dass die Ergebnisse mit denen aus den Freilandversuchen vergleichbar sind. Die Daten für 29 Präparate aus den letzten 15 Jahren, die sowohl im Blütensystem als auch im Freiland geprüft wurden ergaben eine gute Korrelation zwischen den Testsystemen. Mit dem Blütensystem steht eine Methode zur Verfügung, mit der der Probenumfang bei der Mittelprüfung gegen Feuerbrand deutlich erhöht werden kann. Nur im Blütensystem wirksame Präparate sollten im Freiland weiter geprüft werden.

Literatur

Chen XH, Scholz R, Borriess M, et al., 2009. Difficidin, bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *Journal of Biotechnology* **140**, 38-44.

Hinze M, Köhl L, Kunz S, et al. Real Time PCR Detection of *E. amylovora* on Blossoms Correlates with Subsequent Fire Blight Incidence. *Phytopathology* **submitted**.

Kunz S, 2004. Development of "Blossom-Protect" - a yeast preparation for the reduction of blossom infections by fire blight. In: Fökoe.V., ed. *11th International Conference on cultivation technique and phytopathological problems in organic fruit-growing and viticulture*. Weinsberg: FÖKO e.V., 108-14.

Kunz S, Donat C. Field results for the efficacy of fire blight control agents in the last 15 years in Germany. *Acta Hort. (ISHS)* **in press**.

Kunz S, Mendgen K, Haug P, Schmitt A, 2011. Entwicklung von Strategien zur Feuerbrandbekämpfung im ökologischen Obstbau. In.: *Organic E-Prints*.

29-6 - Tn5 Mutagenese zur Identifikation von relevanten Eigenschaften bakterieller Feuerbrand-Antagonisten im Pflanzensystem

Tn5 mutagenesis as a method for identification of essential features of Fire Blight antagonists in plant systems

Christine Hübert, Helmut Junge², Kristin Dietel², Annette Wensing, Wilhelm Jelkmann

Julius Kühn Institut, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau

²ABITEP GmbH, 2489 Berlin, Deutschland

In der Entwicklung von mikrobiellen Antagonisten für den Pflanzenschutz zeigt sich oft eine hohe Diskrepanz zwischen guten Hemmwirkungen im Laborversuch und nur mäßigen Wirkungsgraden unter Praxisbedingungen. Oft stehen für die entscheidenden Praxisversuche z.B. in der Feuer-

brandbekämpfung nur begrenzt Versuchsflächen zur Verfügung. Zusätzlich unterliegen die Freilandversuche im Vergleich zu Laborbedingungen höheren Schwankungen bedingt durch Witterungs- und wechselnde Standorteinflüssen. Eine bessere Vorauswahl der möglichen Behandlungsvarianten unter Laborbedingungen wäre daher wünschenswert, um die knappen Freilandkapazitäten besser und effektiver nutzen zu können. Die beschriebenen Mechanismen zur antagonistischen Aktivität reichen von Konkurrenz um Nahrungs- und Besiedelungsangebot bis hin zur Bildung von Komponenten mit toxischer Wirkung auf das Pathogen. Die direkte Hemmwirkung eines Antagonisten auf den Feuerbanderreger *Erwinia amylovora* durch die Bildung von Toxinen ist im Labor mit verschiedenen Methoden leicht zu quantifizieren. Auf der behandelten Blüte ist die Wirkung des Antagonisten jedoch nicht immer ausschließlich auf ein solches Toxin zurückzuführen, sondern beruht wahrscheinlich auf einem komplexen Interaktionsmechanismus. Durch den Einsatz eines modifizierten Tn5 Konstrukts (pRL27; Larson et al., 2002) lassen sich Zufallsmutationen erzeugen und auf diese Weise Genregionen unterbrechen, die einen bisher unbekanntem Einfluss auf die Hemmwirkung der Antagonisten haben können. Problematisch gestaltet sich das Screening nach Mutanten mit einer verlorenen oder verminderten Hemmaktivität, da zum einen ein hoher Durchsatz erreicht und zum anderen ein pflanzliches System eingesetzt werden soll, das mehr den Bedingungen in der Praxis entspricht. Unter Abwandlung eines von Vogel et al. (2012) an *Arabidopsis* entwickelten Testsystems wurden Tn5-Mutanten verschiedener Antagonisten auf ihre Effizienz gegenüber *E. amylovora* auf Birnenscheiben und Apfelblüten getestet. Der Einsatz eines lumineszierenden Reporterstammes von *E. amylovora* erlaubte dabei einen Durchsatz im 96-well Format für das Primärscreening. Das individuelle Wachstumsverhalten der selektierten Klone in verschiedenen Nährmedien und auf der Pflanzenoberfläche wurde ebenfalls verglichen. Das verwendete Plasmid pRL27 erlaubt zudem eine vereinfachte Identifikation der Transposon-Insertionsstelle in den selektierten Klonen, wodurch relevante Eigenschaften für antagonistische Fähigkeiten bestimmt werden können. Diese Informationen und die Entwicklung von Screening-Verfahren auf der Pflanze ermöglicht eine bessere Vorauswahl von geeigneten Antagonisten gegen den Feuerbanderreger.

Literatur

- Larsen, R. A., M. M. Wilson, A. M. Guss, W. W. Metcalf, 2002: Genetic analysis of pigment biosynthesis in using a new, highly efficient transposon mutagenesis system that is functional in a wide variety of bacteria. *Arch Microbiol* **178** (3), 193-201.
- Vogel, C., G. Innerebner J., Zingg, and J. A. Vorholt, 2012: Forward Genetic *In Planta* Screen for Identification of Plant-Protective Traits of *Sphingomonas* sp. Strain Fr1 against *Pseudomonas syringae* DC 3000. *Appl Environ Microbiol* **28** (16), 5529-5535.

29-7 - Charakterisierung bakterieller Blattfleckererger an Radies

Characterization of leaf spot causing bacteria on red radish

Inka S. Scholze, Ralf T. Vögele², Hermann-Josef Krauthausen

Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz

²Universität Hohenheim, Institut für Phytomedizin

In den vergangenen Jahren kam es zu einem vermehrten Auftreten schwarzer und brauner Blattflecken an Radies (Krauthausen et al., 2009), einer der wichtigsten Gemüsekulturen in Rheinland-Pfalz. Da dem Blattmaterial als Frischemerkmal eine hohe Bedeutung beigemessen wird, führten auftretende Symptome zu hohen wirtschaftlichen Einbußen, obwohl die Knolle selbst nicht betroffen ist. Bei ersten Untersuchungen wurden verschiedene Bakterien, vor allem *Pseudomonaden* und *Xanthomonas campestris*, von befallenen Pflanzen isoliert. Der genaue Erregerkreis war bislang ungeklärt.

Im Rahmen eines dreijährigen BLE-Innovationsprojektes erfolgten Untersuchungen zur Identifikation des Erregerkreises und zur Klärung der biotischen und abiotischen Einflussfaktoren auf den Infektionsverlauf sowie die Entwicklung einer Screeningmethode zum Nachweis resistenter Pflan-